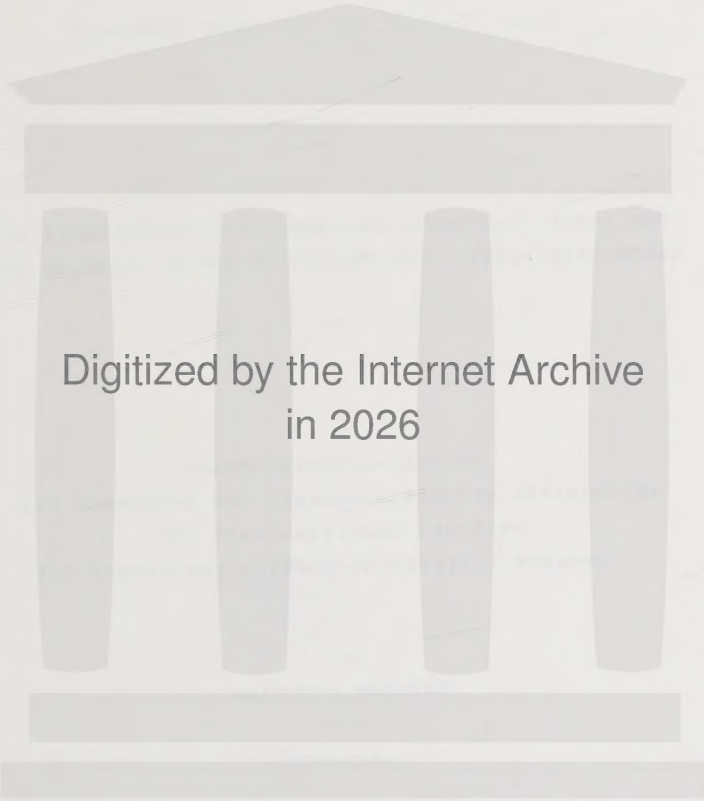


**DIE ERARBEITUNG SEROLOGISCHER
VERFAHREN (IFAT, IHA)
ZUM NACHWEIS EINER SARCOCYSTIS-INFEKTION
BEIM SCHAF**

Brigitte Roscher

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549007_0037

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

DIE ERARBEITUNG SEROLOGISCHER VERFAHREN (IFAT, IHA)
ZUM NACHWEIS EINER SARCOCYSTIS-INFEKTION BEIM SCHAF

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
BRIGITTE ROSCHER
aus
Frauenau

München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Bock

Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 29. Februar 1980



Meiner Großmutter Viktoria und
meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung.....	1
II. Biologie und Pathogenität der Schafsarko- sporidien, sowie Möglichkeiten des sero- logischen Nachweises (anhand der Literatur)....	2
III. Eigene Untersuchungen	
A. Material und Methoden	8
B. Ergebnisse	15
1. Klinischer Verlauf der experimentellen Sarcocystis ovicanis-Infektion bei Schafen..	15
2. Titerverlauf (IFAT und IHA) bei künstlich infizierten Schafen	17
3. Brauchbarkeit des Intradermaltestes	20
4. Parasitologische und serologische Durch- seuchungsuntersuchungen an Schlachtschafen..	22
IV. Besprechung der Ergebnisse	25
V. Zusammenfassung, Summary	29
VI. Literaturverzeichnis	31
Lebenslauf	

I. Einleitung

Parasitologische Untersuchungen der letzten Jahre ergaben bei Schlachtschafen einen Sarkosporidienbefall (mikroskopische Zysten) von 66 - 85 %. Vereinzelt durchgeführte serologische Untersuchungen zeigten, daß über 90 % der untersuchten Schafe Titer aufwiesen. Allerdings konnte eine Interpretation der serologischen Ergebnisse bezüglich des Infektionsstadiums nicht vorgenommen werden.

Es war das Ziel dieser Arbeit, den indirekten Hämagglutinationstest (IHA) zum Nachweis von Sarkosporidieninfektionen bei Schafen zu erarbeiten. Mit Hilfe dieser Methode und des Immunfluoreszenzantikörpertests (IFAT) sollten an künstlich mit *Sarcocystis ovicanis* infizierten Lämmern die Titerentwicklung über mehrere Monate beobachtet werden, Titerverlaufskurven erstellt und Grenztiter festgelegt werden. Schließlich sollte durch vergleichende parasitologische und serologische Untersuchungen von natürlich infizierten Schafen Aufschluß erzielt werden über die Brauchbarkeit des IHA und des IFAT für Durchseuchungsuntersuchungen.

II. Biologie und Pathogenität der Schafsarkosporidien,
sowie Möglichkeiten des serologischen Nachweises
(anhand der Literatur)

Licht in das Dunkel der Biologie von Sarkosporidien des Schafes brachten erstmals ROMMEL, HEYDORN und GRUBER (1972). Sie verfütterten Hammelschlünde, die von nur mikroskopisch feststellbaren *Sarcocystis tenella* befallen waren, an 6 kokzidienfrei aufgezogenen Katzen; diese Tiere schieden keine Sporozysten aus. Daraufhin gaben die Autoren in drei zeitlich getrennten Versuchen an insgesamt 16 Katzen (6 kokzidienfrei aufgezogen, 10 konventionell gehalten) isolierte, makroskopisch sichtbare Zysten von *S.tenella*. Daraufhin schieden die Katzen für 3-53 Tage mit dem Kot bereits sporulierte, farblose Sporozysten ohne Stiedaekörperchen aus. Diese enthielten 4 Sporozoiten und einen Restkörper. Die Kotuntersuchung von 4 Kontrollkatzen verlief stets negativ. Wurden jedoch diese makroskopischen *S.tenella*-Zysten an 10 Hunde (5 gnotobiotisch, 4 kokzidienfrei, 1 konventionell gehalten) verfüttert, ließen sich Sporozysten nicht nachweisen. Für die mikroskopischen Zysten des Schafes erwies sich demnach der Hund, für die großen Zysten die Katze als Endwirt. Die Präpatenz betrug etwa 12 Tage, die Patenz etwa 3 Monate. In weiteren Versuchen bestätigten ROMMEL und Mitarb. (1974) ihre früheren Befunde, wonach Hunde nach der Verfütterung von Hammelschlünden mit nur mikroskopisch sichtbaren Zysten Sporozysten ausschieden.

GESTRICH, SCHMITT und HEYDORN (1974) infizierten 8 Wochen alte Lämmer mit 1,6 bzw. 2 Millionen Sporozysten von *S.tenella*, die sie aus dem Kot von Hunden gewonnen hatten; die Tiere waren zuvor mit sarkosporidienhaltigem Schaffleisch gefüttert worden (*Sarcocystis ovicanis*). Die Lämmer zeigten 14 Tage p.i. Fieber, Anämie und Inappetenz; am 24. und 25. Tag p.i. starben die Versuchstiere.

Auch MUNDAY, BARKER und RICKARD (1975) infizierten Lämmer mit Sporozysten aus Hundekot; 14 Tage p.i. fanden sie Schizonten mit unreifen Merozoiten im Endothel kleiner Arterien und Arteriolen, ferner in Kapillaren, Mesenteriallymphknoten, Skelettmuskel und Herz, 24 Tage p.i. nur noch reife Merozoiten. Bei einem am 42. Tag p.i. getöteten Lamm traten bereits Sarkosporidienzysten mit Metrozyten auf.

HEYDORN und GESTRICH (1976) infizierten Lämmer mit 2 Mio. bzw. 100 000 Sporozysten von *S.ovicanis*. Die beiden Lämmer mit der Infektionsdosis von 2 Mio. starben am 25. bzw. 29. Tag p.i. Von den 3 Versuchstieren, die nur 100 000 Sporozysten erhielten, überlebten alle und wurden am 41., 68. und 81. Tag p.i. getötet und auf Zysten untersucht. In der Muskulatur des ersten Tieres ließen sich lichtmikroskopisch nur unreife Zysten nachweisen; sie enthielten nur Metrozyten und wiesen eine kaum wahrnehmbare Membran auf. Ab 68. Tag p.i. enthielten die Zysten neben Metrozyten auch Zystozoiten (Merozoiten), die Zystenwände erschienen gestreift und unterschiedlich dicht. Mit verschiedenen hohen Dosen von *S.ovicanis*-Sporozysten infizierten LEEK und FAYER (1977) 11 trächtige Mutterschafe. 8 Tiere abortierten und starben, oder mußten mit den Symptomen einer akuten Sarkosporidiose eingeschläfert werden.

Nach einem Vorschlag von HEYDORN und Mitarb. (1975) wurden die beiden Sarkosporidienarten des Schafes, unter Berücksichtigung von Zwischen- und Endwirt als *Sarcocystis ovicanis* (Endwirt Hund) und *S.ovifelis* (makroskopischer Typ, Endwirt Katze) benannt. Diese Namen werden im folgenden von mir verwendet.

Das klinische Bild der akuten Sarkosporidiose des Schafes ist recht typisch. Ab dem 11. Tag p.i. zeigen mit *S.ovicanis* infizierte Lämmer Fieber (bis 41.9°C), Inappetenz, Dyspnoe und Anzeichen einer Myositis. LEEK und FAYER (1978) beobachteten auch zentralnervöse Störungen mit Festliegen, Opisthotonus, Nystagmus und Ruđerbewegungen. Pathologisch-anatomisch beschreiben GESTRICH, SCHMITT und HEYDORN (1974)

bei an akuter Sarkosporidiose verendeten Lämmern petechiale Blutungen in allen Organen und in der Skelettmuskulatur, sowie Myositis und Lymphknotenschwellung. Im nach Giemsa gefärbten Muskelpräparat zeigten sich Schizonten in Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge, Lymphknoten, Muskulatur, Zwerchfell, Oesophagus, Zungenmuskulatur und Dünndarmwand. LEEK, FAYER und JOHNSON (1977) berichten ferner über eine Glomerulonephritis, MUNDAY, BARKER und RICHARDS (1975) über eine nichteitrige Meningoenzephalitis. JUNGSMANN und HIEPE (1975) stellten histopathologisch an Schlachtkörpern von stark mit Sarkosporidien befallenen Schafen eine Myositis eosinophila fest.

Schon vor der Aufklärung des Entwicklungszyklus wurde versucht, die Sarcocystis-Infektion bei Schafen serologisch nachzuweisen. AWAD (1958) erprobte bereits die Komplementbindungsreaktion (KBR) an 245 Schafseren. Von 134 Tieren, bei denen der Parasitennachweis geführt werden konnte, waren 113 in der KBR positiv. Von den 111 parasitologisch negativen Schafen zeigten 58 Titer in der KBR bis 1:80. Als Grenztiter wurde 1:10 angenommen. PIEKARSKI, SCHÄFER und NIEDERLÄNDER (1961) untersuchten 223 Schafe, von denen 6 ohne nachweisbaren Parasitenbefall waren, mit Antigen aus makroskopischen Sarcocystis tenella-Zysten auf Antikörper. Von den 217 Seren reagierten 156 serologisch positiv. Die Autoren schlossen daraus, daß ältere Schafe fast zu 100 % von Sarkosporidien befallen sind und ein positiver Titer in der KBR auf einen Befall schließen läßt; nicht alle parasitologisch positiven Tiere hatten jedoch Titer. MUNDAY und CORBOULD (1974) führten die KBR mit S.ovifelis-Antigen an 339 Schafseren durch. Als Positivkontrolle dienten Seren von Schafen mit bekannter Sarkosporidieninfektion, als Negativkontrolle Seren von kolostrumfrei und isoliert aufgezogenen Lämmern. Ein Titer von 1:10 wurde als signifikant angesehen.

Der von ENGVALL und PERLMANN (1972) entwickelte und von RUIJTENBERG und VAN KNAPEN (1977) zum Mikrosystem

modifizierte Enzym-linked-Immunosorbent Assay (ELISA) wurde bisher zum Nachweis von Sarcocystis-Antikörpern nur von KLIMA (1979) und BIERSCHECK (1979) versucht. BIERSCHECK (1979) untersuchte 461 Seren von Schlachtschafen und 3 Kontrollseren; als Positivkontrolle benutzte er ein Serum, das sich beim Parasitennachweis (Trypsinverdauung) als stark positiv erwiesen hatte und einen Titer von 1:512 im ELISA hatte. Die Negativkontrollen stammten von 5 Wochen alten Lämmern. Sie hatten einen Titer von 1:16 und 1:32. Bei allen 461 Seren ließen sich Titer ermitteln, auch bei solchen Tieren, die parasitologisch negativ waren. Zwei Drittel aller Titer lagen zwischen 1:32 und 1:64. Hohe Titer (1:512 und 1:1024) traten nur bei 3 Seren auf. KLIMA (1979) untersuchte Seren von experimentell und natürlich mit Sarkosporidien infizierten Schweinen, Rindern und Hunden mit Sporozysten- und Zystozoiten-Antigen verschiedener Sarkosporidienarten, u.a. von *S.ovifelis* und *S.ovicanis*. Sie konnte spezifische Antikörper bei Rind und Schwein mit Titern von 1:64 und 1: 256 nachweisen. Eine Artendifferenzierung ließ sich dabei auch nach säulenchromatographischer Auftrennung der Antigene mit dem ELISA nicht erzielen. Bei vergleichenden Untersuchungen am Rind traten keine Kreuzreaktionen zwischen Toxoplasmen und Sarkosporidien bzw. zwischen Sarkosporidien und Hammondien auf. Als Grenztiter wurde die Verdünnung von 1:32 gewertet.

Der Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) nach COONS und Mitarb. (1942) und COONS und KAPLAN (1950) beruht auf dem Nachweis von Antigenen mittels fluorchrommarkierter Antikörper. Die Immunkomplexe werden bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht durch das Auftreten einer Fluoreszenz sichtbar. Diesen Test benutzten TADROS, LAARMAN und VAN DEN EIJK (1974) zum Nachweis von *Isospora hominis*-Antikörpern beim Menschen. Als Antigen verwendeten sie zerriebene *S.fusiformis*-Zysten aus dem Rind. Da Kreuzreaktionen mit *Sarcocystis tenella* (*S.ovifelis*) auftreten,

schlugen die Autoren bei umfangreichen Untersuchungen die Verwendung von *S.ovifelis* als Antigen vor. Auch NEDJARI, JUNGMANN und HIEPE (1976) konnten eine experimentelle *S.bovicanis*-Infektion beim Rind mit dem IFAT nachweisen. Die Titer bewegten sich zwischen 1:40 und 1:640. Von der 5. bis zur 11. und 12. Woche p.i. stiegen sie bei allen Kälbern an und blieben bis zum Ende der Untersuchung auf der maximalen Höhe. Schlachtung und histologische Untersuchung bestätigten das Ergebnis. PEREIRA und PEREZ (1976) fanden bei Untersuchungen an Schlachtschafen, deren Muskelproben bei der Trypsinverdauung zu 86 % positiv waren, mit dem IFAT Titer von 1:20 bei allen parasitologisch positiven Tieren. Als Antigen benutzten sie *S.ovifelis*-Zoiten. Auch bei Rinderseren erbrachte dieses Antigen zu 83 % Titer bis zu 1:20 und höher.

ARYEETAY und PIEKARSKI (1976) wiesen bei vergleichenden Sarcocystis-Untersuchungen an Mensch und Ratte mit dem IFAT eine frühzeitige Antikörperbildung nach Aufnahme von rohem Rindfleisch nach. Titer von 1:64 - 1:256 traten ab dem 25. Tag p.i. bei den Humanseren auf. Ratten, die mit *S.ovifelis*-haltiger Muskulatur gefüttert worden waren, zeigten nach 42 bis 102 Tagen p.i. Titer von 1:256. Tiere, welche *S.fusiformis* vom Rind erhalten hatten, zeigten dagegen schon 14 Tage p.i. Titer von 1:64 und 1:256. Kreuzreaktionen zwischen Toxoplasmen und Sarcocystis wurden dabei nicht beobachtet. Dies haben auch FULTON und VOLLER (1964), PIEKARSKI und SAATHOFF (1962) sowie ANDRADE und WEILAND (1972) berichtet.

Nachdem DIEZ-BANOS, CORDERO DEL CAMPILLO und ROJO VAQUEZ (1978) an 467 Schlachtschafen verschiedenen Alters und Geschlechts parasitologisch einen Befall von 68,95 % festgestellt hatten, untersuchten sie 366 Seren mit dem IFAT, dem Agglutinationstest, der Immunelektrophorese und im Immunodiffusionstest. Alle Antigene stammten aus

S.ovifelis-Zysten, die verschieden aufbereitet worden waren. Als zuverlässiger Test erwies sich der IFAT, bei dem sich 94,83 % der Seren mit Titern höher als 1:40 als positiv erwiesen. Der Agglutinationstest zeigte dagegen nur 86 % positive Seren mit Titern über 1:80. Nicht zufriedenstellend waren die Ergebnisse im Immundiffusionstest und in der Immunelektrophorese.

Über die Untersuchung von 141 Serumproben sardischer Schafe und von 140 Schweineseren berichten ARRU und Mitarb. (1978). Sarkosporidien fanden sie in den Muskelproben von 96 der 106 überprüften erwachsenen Schafe. 5 dieser befallenen Tiere reagierten serologisch negativ, die übrigen zeigten Titer von 1:20 - 1:4000. Die 10 parasitologisch negativen Tiere zeigten fluoreszenzserologisch eine positive Reaktion. Bei Lämmern wurden Muskelzysten nicht festgestellt. Während neugeborene Lämmer serologisch negativ waren, zeigten Lämmer ab dem 35. Tag bereits Titer.

Der indirekte Hämagglutinationstest (IHA) wurde bisher nur von LUNDE und FAYER (1977) zum Nachweis einer Sarkosporidiose an künstlich mit Sporozysten aus Hundekot infizierten Kälbern angewandt. Als Antigen verwendeten sie aufbereitete Zystozoiten von *S.bovicanis*, die sie aus dem Herzmuskel eines künstlich infizierten Kalbes gewonnen hatten. Serumtiter traten ab dem 30. Tag p.i. auf und stiegen auf Werte von 1:39 000 am 90. Tag p.i. an. Die gleichzeitig an Seren von Milchkühen durchgeführten Untersuchungen erbrachten zwar Titer bis 1:486; da Krankheitssymptome fehlten, wurden sie vom Autor als nicht signifikant angesehen.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

Als Versuchstiere standen mir 12 Schaflämmer zur Verfügung. 3 davon stammten aus der institutseigenen Zucht und dienten als Kontrolltiere, 9 Lämmer wurden aus einer Schäferei (offene Laufstallhaltung) zugekauft. Es handelte sich um Tiere verschiedener Rassen (Merinolandschaf, Dt. Schwarzköpfiges Fleischschaf, Bergschaf), 5 weibliche und 7 kastrierte männliche Tiere. Sie wurden während des Versuchs in einem eingezäunten Gehege mit befestigtem Unterstand gehalten. Als Futter erhielten sie Wasser und Heu ad libitum und dazu täglich eine Ration pelletiertes Lämmermastfutter. Zur Zeit der Infektion waren alle Tiere etwa 4 Monate alt und ca. 35 kg schwer.

Das Infektionsmaterial (Sporozysten) war durch Verfütterung von Sarcocystis ovis- und S. spec.-haltigen Schafschlünden, Zungen und Zwerchfell an Hunde gewonnen worden. Die von den Hunden mit dem Kot ausgeschiedenen Sporozysten waren durch wiederholte Flotation mit $Zn\ Cl_2$ Na Cl angereichert worden.

Es erfolgte eine Einteilung der Versuchstiere in 3 Gruppen, die mit verschiedenen Dosen infiziert wurden. Gruppe 1 umfaßte 6 Tiere mit einer Sporozystendosis von 50 000, Gruppe 2 drei Tiere mit einer Dosis von 5000 Sporozysten. Die Gruppe 3 stellte mit 3 Lämmern die Kontrollgruppe dar. Am 159. Tag nach der Erstinfektion wurden verschiedene Tiere reinfiziert. 2 Lämmer der Gruppe 1 erhielten eine homologe Belastungsinfektion mit je 500.000 Sporozysten, je ein Tier der Gruppen 1 und 2 90.000 Sporozysten von Sarcocystis ovifelis (heterologe Infektion). Das Infektionsmaterial wurde grundsätzlich über die Schlundsonde in wässriger Aufschwemmung verabreicht.

Die klinische Überwachung erfolgte durch tägliche Temperaturkontrolle und Beobachtung des Allgemeinbefindens der Tiere über 30 Tage während der frischen Phase der Infektion.

Um Serum für die serologischen Untersuchungen zu gewinnen, die ja Aufschluß über die Antikörperbildung mittels des Titerverlaufs erbringen sollten, wurde den Schafen die ersten 6 Wochen 3 x wöchentlich, dann die nächsten 4 Wochen 2 x wöchentlich und schließlich 1 x wöchentlich Blut aus der Vena jugularis entnommen.

Zur Feststellung der Zystenbildung und damit des tatsächlichen Angehens der experimentellen Infektion dienten Biopsien. Hierzu erhielten die Schafe pro Tier 0,3 ml 2,5 %iges Xylazin (Rompun, BAYER AG) i.v. und 2 ml Xylocain als Epiduralanaesthesie. Die laterale Fläche des Oberschenkels wurde geschoren, rasiert, mit Wasser und Seife gereinigt und mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Dann wurde ein etwa 7 cm langer Hautschnitt im Bereich des M.biceps (kaudale Portion) angelegt, die Faszie von der Haut abpräpariert und ein etwa 3 x 3 x 1,5 cm großes Stück des M.biceps exzidiert. Die Blutstillung erfolgte durch Abklemmen größerer Gefäße und Drucktamponade der Wundhöhle mit steriler Gaze. Die Wunde wurde mit Knopfnähten verschlossen, eine doppelte Lage Gaze mit oberflächlichen Stichen an der Haut befestigt und am nächsten Tag entfernt. Einen eventuell auftretenden Sekretstau beseitigte ich durch stumpfes Spreizen der distalen Wundränder, gleichzeitig versorgte ich die Tiere über mehrere Tage mit Antibiotika (Paratopen^R, Fa. Grüntex).

Zur Antigengewinnung für die Serologie sammelte ich an verschiedenen Schlachthöfen Schlünde von ca. 2000 Schafen; nur so erhielt ich die notwendige Menge von Sarcocystis ovifelis. Die Zysten präparierte ich möglichst ohne anhaftende Muskelteile mit Präpariernadel und Pinzette aus der Schlundmuskulatur heraus und legte sie zur Reinigung in PbS pH 7,2. Zur Gewinnung der Zystozoiten zerschnitt ich die Zysten mit einer Schere, zerrieb die Teile auf Nylongaze, spülte mit Phosphatpuffer und wusch die Zoiten durch die Maschen der Gaze in Zentrifugengläser aus. Die Zystenwände schüttelte ich daraufhin noch mit

Glasperlen aus und seihete die dadurch gewonnene Zystozoitensuspension ebenfalls durch die Gaze ab. Die Zystenwände wurden anschließend in PbS aufgenommen und eingefroren. Die Zoitensuspension wurde 10 Minuten bei 4000 U/Min. abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. Den Bodensatz (gepackte Zoiten) resuspendierte ich mit PbS zu einer etwa 50 %igen Suspension; diese wog ich ab, und versetzte sie mit ca. 10 % Glycerin (Fa. Merck, Art. 4095). Diese Zoitensuspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße portioniert und bei -40°C eingefroren. Zur Herstellung von Extraktantigen für den indirekten Hämagglutinationstest zerrieb ich die Zystenwände 45 Min. im Zellhomogenisator und extrahierte anschließend im Kühlschrank über Nacht mit PbS. Die Zystozoiten zerstörte ich mit Ultraschall und extrahierte sie ebenso. Anschließend zentrifugierte ich die Extrakte 20 Minuten bei 20 000 U/Min. (44720 g) und 4°C in einer Sorvall RC 2B Zentrifuge ab. Der Überstand stellte das Extraktantigen dar, der Bodensatz wurde verworfen. Die weitere Aufarbeitung des Extraktantigens geschah über die Säulenchromatographie, Dialyse und Lyophilisierung. Die säulenchromatographische Auftrennung erfolgte am Ultrogel AcA 22 (Fa. LKB) mit einem effektiven Trennungsbereich für globuläre Proteine eines Molekulargewichts von 100 000 - 1 200 000, die Aufbereitung des Gels nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Als Elutionsflüssigkeit diente entlüfteter Phosphatpuffer pH 7,2. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10 ml/h; die Elutionskurven wurden nach Messung bei 254 nm im Uvicord II (Fa. LKB) geschrieben und die Fraktionen automatisch im UltroRac (Fa. LKB) gesammelt.

Die einzelnen Fraktionen unterwarf ich einer 24stündigen Dialyse in Zellophanschläuchen. Das Dialysat, bestehend aus 1 Teil doppelt physiologischem PbS und 9 Teilen Aqua dest., bedeckte die Probe vollständig. Die dialysierten Proben wurden in Portionen von 2 ml in Glasampullen gefüllt und lyophilisiert. Die Ampullen verschloß ich

mit Parafilm und bewahrte sie im Kühlschrank bei 4°C auf. Vor Gebrauch führte ich eine Proteinbestimmung nach FOLIN-CIOCALTEAU, modifiziert nach LOWRY, durch.

Für den Intradermaltest gewann ich *S.ovicanis*-Antigen aus Schafschlünden und Zwerchfell. Die Proben wurden kleingeschnitten und in Erlmeyerkolben mit Glasperlen und physiologischer Kochsalzlösung ausgeschüttelt, durch ein Teesieb abgeseiht und 10 Min. bei 3000 U/Min. abzentrifugiert. Im Bodensatz befanden sich die mikroskopisch nachweisbaren Zysten. Stark befallene Proben wurden mit einer 2,5 % Trypsinlösung (in PbS) versetzt und auf dem Magnetrührer 20 Min. trypsiniert. Dann wurde abgeseiht, abzentrifugiert und 3 x mit PbS (nach ERBER, 1977) gewaschen.

In eine 10 ml Glasspritze gab ich zuerst Glaswolle (ca. 2 mm dick), darauf legte ich Nylongaze und darüber schichtete ich Sephadex QÆ 50 Zellulosepulver, das mit EDTA-PbS (0,02 %ig) zum Quellen gebracht wurde, dadurch entstand eine 1 cm hohe Säule (nach TANABE und MITARB., 1977). Darauf pipettierte ich die trypsinierte Probe und EDTA-PbS. Mit einer weiteren Spritze, die mit der ersten durch einen kleinen Gummischlauch verbunden war, sog ich den Puffer und die Zoiten durch die Säule, während das Muskeleiweiß weitgehend in der Säule zurückblieb. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben für die *S.ovifelis* Zoiten angegeben, jedoch ohne säulen-chromatographische Auftrennung.

Für den Fluoreszenztest wurden die mit Glyzerin eingefrorenen Zoiten vor Gebrauch 3x mit PbS gewaschen und anschließend eine etwa 20 %ige Suspension in PbS hergestellt, deren Zoitendichte lichtmikroskopisch untersucht wurde. Für den IFAT genügte eine Zoitendichte von 10 - 15 Zoiten pro Blickfeld. Diese Suspension tropfte ich auf vorgefertigte Objektträger auf und ließ sie trocknen. Als beste Fixierungsmethode hatte sich eine kombinierte Aceton (10 Min.)/Alkohol (1 Min.)-Fixierung erwiesen.

Fixierte, antigenbeschichtete Objektträger waren in Seidenpapier und Alufolie verpackt monatelang in der Gefriertruhe haltbar.

Die Serumverdünnungen für die Antikörpertitration stellte ich in Mikrotiterplatten in Phosphatpuffer pH 7,2, in der zweifachen Verdünnungsreihe, beginnend mit 1:5, her. Von der Verdünnungsreihe wurden, beginnend mit der höchsten Verdünnung, jeweils 25 µl in die mit Antigen beschichteten Reaktionsfelder der Objektträger getropft und diese dann 30 Min. bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend spülte ich die Serumverdünnungen mit PbS ab und wusch sie noch 2 x 5 Minuten in PbS. Als Konjugat benutzte ich mit FITC gekoppeltes Rabbit anti-Sheep IgG, heavy and light chains (Cappel Lab., Cochrainville). Die Gebrauchsverdünnung wurde im Vorversuch mit 1:30 ermittelt und zur Gegenfärbung Evans Blue 1:5000 zugesetzt. Vom Konjugat wurden jeweils 10 auf die Reaktionsfelder aufgebracht und die Objektträger nochmals für eine halbe Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Abspülen des Konjugats und Waschen in PbS deckelte ich die Objektträger für die Auflichtmikroskopie (Orthoplan, Fa. Leitz, 6,3 x 40fache Vergrößerung und der Filterkombination 3 Ploemopak) mit Glyzerin ein.

Bei jedem Ansatz wurden eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle (Serum eines SPF-Lammes) und eine serumfreie Konjugatkontrolle mitangesetzt. Als positiv wurde die Verdünnungsstufe angesehen, bei der die Zoiten eine deutlich grüne Randfluoreszenz aufwiesen. Als negativ galt eine Probe, bei der die Zoiten nur rot erschienen bzw. eine Polkappenfluoreszenz hatten.

Der indirekte Hämagglutinationstest (IHA) wurde nach der Methode von WEIR (1973) durchgeführt. Die Erythrozyten (Hammelblut, Fa. Behringwerke) wusch ich vor Gebrauch 3 x mit Phosphatpuffer pH 7,2, packte sie dann 15 Min. bei 750 g; 25 ml gepackte Erythrozyten pipettierte ich darauf in einen 500 ml Erlmeyerkolben und suspendierte sie mit 200 ml PbS.

Um eine Hämolyse der Erythrozyten bei der Fixierung mit 40 %igem Formalin zu vermeiden, füllte ich zunächst 50 ml davon in einen Zellophandialysierschlauch, sodaß dieser etwa zu zwei Drittel gefüllt war. Diesen hängte ich in die Erythrozytensuspension und ließ das Ganze 3 Stunden langsam auf dem Magnetrührer rühren. Danach schnitt ich den nunmehr prall gefüllten Dialysierschlauch auf und ließ über Nacht weiter rühren. Schließlich wurden die Erythrozyten durch doppelte Gaze abgeseiht und das Formalin bei 750 g für 10 Min. abzentrifugiert, die Erythrozyten 5 x mit PbS gewaschen und eine 50 %ige Suspension in PbS hergestellt. Zur Sensibilisierung löste ich 1 g Tannin in 50 ml PbS.

0,6 ml gepackte, formalinfixierte Erythrozyten löste ich in 10 ml PbS, fügte 10 ml der Tanninlösung hinzu und inkubierte das Gemisch bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde 5 Min. lang bei 750 g abzentrifugiert, mit 20 ml PbS gewaschen und dann mit 10 ml PbS resuspendiert.

Den sensibilisierten Erythrozyten fügte ich in der Folge 10 ml Antigenlösung, mit einem Proteingehalt von 0,8 mg/ml Zystenwandantigen von *S.ovifelis*, hinzu und inkubierte 30 Min. bei 37°C im Wasserbad. Die antigenbeladenen Erythrozyten wusch ich 3 x mit 1 %igem PbS-BSA und stellte schließlich eine 1 %ige Gebrauchsverdünnung der Erythrozyten in PbS-BSA her.

Die Seren wurden für den IHA 30 Min. bei 56°C inaktiviert, die Serumverdünnung wurde in Rundboden-Mikrotiterplatten mit Tris-HCl Pufferlösung (Fa.Behring) in zweifacher Verdünnungsreihe, beginnend bei 1:5, hergestellt. Bei jedem Ansatz setzte ich eine positive Kontrolle, eine negative Kontrolle (Serum eines SPF-Lammes), eine Erythrozytenkontrolle (mit Antigen beladen) und eine weitere Erythrozytenkontrolle (sensibilisiert, ohne Antigen) mit an. Eine weitere Testkontrolle bestand im Ansetzen von sensibilisierten Erythrozyten (ohne Antigen) mit Serum, um auszuschließen, daß unspezifische, im Serum vorhandene Agglutinationsfaktoren eine Agglutination bewirkten (nach MAYR und Mitarb., 1977). In jede Serumverdünnung

wurden 25 µl Erythrozytensuspension eingetropft, die Platten zur Erzielung einer guten Vermischung der Serumverdünnungen mit den Erythrozyten kurz auf den Rüttler gestellt und der Test nach einer Stunde abgelesen. Als positiv galt ein Erythrozytenschleier mit einem dünnen gefältelten Randsaum aus nicht agglutinierten Erythrozyten, als negativ ein deutlicher Erythrozytenknopf. Ein mit lyophilisierten und wieder resuspendierten Erythrozyten durchgeführter Test brachte dieselben Ergebnisse wie ein mit frischen Erythrozyten angesetzter.

Der Intradermaltest (IDT) wurde lediglich an 6 Schafen orientierend durchgeführt. Ich benutzte *S.ovifelis*-Extraktantigen mit einem mittleren Proteingehalt von 1,24 mg/ml und 2,48 mg/ml sowie *S.ovicanis*-Antigen mit einem Proteingehalt von 1,03 mg/ml und 2,06 mg/ml. Als Kontrolle dienten das Lösungsmittel, Phosphatpuffer pH 7,2 (AWAD, 1957), sowie Rinderalbumin (BSA), Preßsaft aus Lammfleisch und Tuberkulin (vom Geflügel, Fa. Hoechst). Den Tieren wurde am Rücken beiderseits der Wirbelsäule das Vlies geschoren, die Haut mit Äther entfettet, an den Injektionsstellen die Hautdicke mit einem Kutimeter (Fa. Hauptner) gemessen, die Stelle mit Filzstift markiert und jeweils 0,1 ml der Antigene und der Kontrollen i.c. gespritzt. Die Hautdicke wurde nach 1,3,5,7,9,24,48,72 Stunden gemessen und die Hautdickenzunahme und evtl. visuelle Veränderungen notiert.

B. Ergebnisse

1. Klinischer Verlauf der experimentellen Sarcocystis ovicanis-Infektion

Eine wichtige Kontrolle über das Angehen der Infektion mit *S.ovicanis* und *S.spec.* bei meinen Schafen stellte während der ersten 30 Tage p.i. die tägliche Messung der Körpertemperatur dar. Der erste Temperaturanstieg bis 40°C konnte am 14. und 15. Tag, der zweite bis 41°C vom 22. bis 28. Tag gemessen werden.

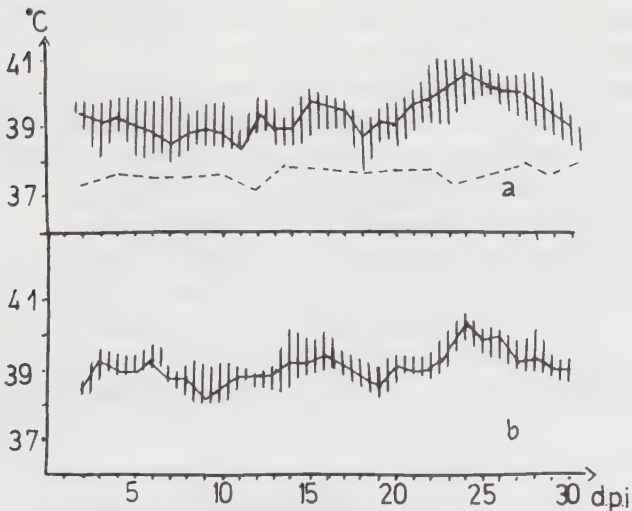


Abb. 1: Fieberkurven der 6 Tiere mit 50 000 Sporozysten (a) und 3 Tiere mit 5000 Sporozysten (b) von *S.ovicanis* und *S.spec.*

---nichtinfizierte Kontrolltiere

Während der Fieberphasen zeigten die Lämmer Inappetenz, frequente Atmung, Bewegungsunlust bis zum Festliegen und Anämie (Blässe der Schleimhäute, HK von 21 v.H.). Nach den Fieberschüben erholten sich die Tiere sehr schnell. Die von mir nicht infizierten Kontrolltiere

zeigten während dieser Zeit weder Fieber noch klinische Erscheinungen.

Um die Zystenbildung und somit das Angehen der Infektion zu überwachen, erfolgten am 71., 85., 105., 140. und am 152. Tag p.i. Biopsien am *Musculus biceps*. Dabei wurde ein etwa walnußgroßes Muskelstück exzidiert und parasitologisch untersucht. Bis zum 105. Tag p.i. zeigten alle mit der Schüttelmethode untersuchten Muskelproben einen Massenbefall mit *S.ovicanis*. Bei 7 infizierten Schafen konnten auch Zysten von *S.spec.* differenziert werden. Am 152. Tag p.i. (2. Biopsie) konnte ich bei allen Tieren eine Abnahme der Zystenzahl (Tab. 1) pro Deckglaspräparat (24 x 60 mm) beobachten. Auch waren die Vorwölbungen an den Längsseiten der Zysten nicht mehr zu sehen (40fache Vergrößerung). Statt dessen beobachtete ich schollige Auflagerungen, die bei 1000-facher Vergrößerung als zerzauste Vorwölbungen erkenntlich waren. Muskelproben von Lämmern, die am 232. Tag p.i. nach der Schlachtung gewonnen worden waren (Herz, Zwerchfell, Bauchmuskel, Schlund und Zunge), enthielten nur noch vereinzelt Zysten, die sich allerdings bei Verfütterung an einen Hund als infektiös erwiesen. Diese Beobachtungen weisen daraufhin, daß es beim Schaf im Laufe der Infektion teilweise zu einer Degeneration von Zysten kommt.

Die am 159. Tag p.i. mit einer homologen Infektion (500 000 Sporozysten) und einer heterologen Infektion (90 000 *S.ovifelis*-Sporozysten) belasteten Tiere zeigten zu keiner Zeit der Reinfektion Fieber und klinische Erscheinungen. Auch konnten keine unreifen Zysten in der Biopsie nachgewiesen werden. Es ist also anzunehmen, daß die Infektionen aufgrund der sich entwickelnden Immunität nicht angegangen sind.

Schaf Nr.	Anzahl der Zysten im Biopsiematerial			
	71.-105. Tag p.i.		152. Tag p.i.	
	S.ovicanis	S.spec.	S.ovicanis	S.spec.
76	38	-	1	-
77	46	3	1	-
78	25	-	1	2
79	31	7	9	12
80	18	7	1	-
81	32	8	8	1
151	23	8	6	-
152	30	5	5	-
153	22	2	3	1

Tab. 1: Anzahl der Zysten von *Sarcocystis ovicanis* und *S.spec.* pro Deckglaspräparat (24 x 60 mm), festgestellt bei Biopsien am 71. - 105. bzw. 152. Tag p.i.

2. Titerverlauf (IFAT, IHA) bei künstlich infizierten Schafen

Es war das Hauptanliegen dieser Arbeit, zwei serologische Verfahren auf ihre Brauchbarkeit zur Feststellung einer Sarkosporidiose bei Schafen zu untersuchen. Von 9 experimentell mit *Sarcocystis ovicanis* und *S.spec.* infizierten Tieren wurden bis zum 230. Tag p.i. Serumproben entnommen und sowohl in der indirekten Fluoreszenz als auch in der indirekten Hämagglutination untersucht. Als Kontrolle diente Serum eines gnotobiotisch aufgezogenen und damit *Sarcocystis*-freien Schafes.

Bei 6 mit 50 000 Sporozysten infizierten Schafen traten in der Immunfluoreszenz erste Titeranstiege 4 bis 11 Tage p.i. mit Werten von 1:80 und 1:160 auf. Maximaltiter von 1:1280 erreichten alle Tiere 21 bis 38 Tage p.i.

Die maximalen Titerwerte bildeten ein kurzes Titer-plateau; sie fielen 41 bis 64 Tage p.i. allmählich ab und lagen 155 Tage p.i. bei 1:80 und 1:160 (Abb. 2).

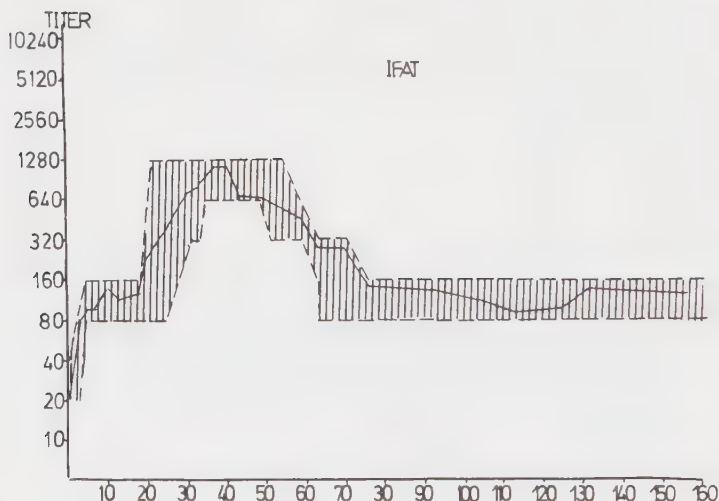


Abb. 2: IFAT: Die Minima-, Maxima- und resultierende Titerverlaufskurve bei den 6 mit 50 000 Sporozysten von *S.ovicanis* und *S.spec.* infizierten Schafe bis zum 155. Tag p.i.

Drei mit 5000 Sporozysten infizierte Schafen zeigten in der Immunfluoreszenz einen ähnlichen Titerverlauf. Erste Titer wurden 4 bis 11 Tage p.i. mit Werten von 1:80 und 1:160 festgestellt. Maximaltiter waren mit Werten von 1:1280 23 und 25 Tage p.i. nachweisbar. Bei diesen Tieren begannen die Titerwerte 34 bis 56 Tage p.i. abzusinken und lagen 155 Tage p.i. ebenfalls bei 1:80 und 1:160.

Im indirekten Hämagglutinationstest waren erste Titeranstiege bei den mit 50 000 Sporozysten infizierten 6 Schafen erst 7 bis 14 Tage p.i. auf 1:80 zu beobachten. Maximaltiter mit Werten von 1:1280 bis 1:10240 wurden 41 bis 85 Tage p.i. erreicht. 56 bis 126 Tage p.i. begannen die Titer abzusinken und lagen 155 Tage p.i. bei 1:80 bis 1:160 (Abb. 3).

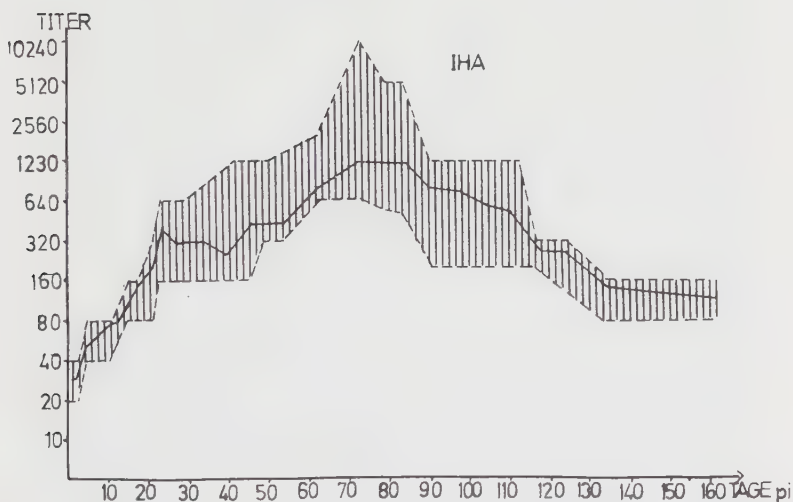


Abb. 3: IHA: Die Minima-, Maxima- und resultierende Titerverlaufskurve bei den 6 mit 50 000 Sporozysten von *S.ovicanis* und *S.spec.* infizierten Schafen bis zum 155. Tag p.i.°

Nicht wesentlich unterscheidet sich der Titerverlauf im IHA bei den 3 mit 5000 Sporozysten infizierten Schafen. Erste Titeranstiege wurden 7 bis 18 Tage p.i. mit Werten von 1:80 bis 1:160 beobachtet; Maximaltiter

traten mit Werten von 1:1280 und 1:2560 25-56 Tage p.i. auf. Der Titerabfall setzte 49 bis 92 Tage p.i. ein. 155 Tage p.i. hatten alle 3 Tiere einen Titer von 1:80 bis 1:160.

Die Reinfektion von 3 Schafen, die mit 50 000 und 1 Schaf, das mit 5000 Sporozysten infiziert worden waren, wurde serologisch durch das Ansteigen der Titer 11 bis 21 Tage post reinfectionem um 3-4 Stufen im IFAT mit Maximalwerten von 1:1280 und 7 bis 30 Tage p.r. um 3-5 Stufen im IHA mit Maximaltitern von 1:1280 bis 1:5160 manifest. Ab dem 25. bis 37. Tag nach der Reinfektion fielen die Titer rasch wieder ab, um sich 37 bis 71 Tage p.r. (196 bis 230 Tage p.i.) auf Titer zwischen 1:40 und 1:160 sowohl im IFAT als auch im IHA einzustellen. Die Sporozystenzahl der Initial- und der Reinfektionen hatte ebenso wenig einen Einfluß auf die Titerhöhe und den Titerverlauf nach der Reinfektion, wie die Anwendung homologer und heterologer Sarkosporidienarten. Bei Versuchsende 230 Tage p.i. hatten alle 9 Versuchsschafe Antikörpertiter gegen Sarkosporidien zwischen 1:40 und 1:160 sowohl in der Immunfluoreszenz als auch in der indirekten Hämagglutination. Das negative Kontrollserum eines gnotobiotisch aufgezogenen Lammes, das mit Sicherheit keine Infektion mit einem zystenbildenden Kokzid durchgemacht hat, hatte in allen Versuchsansätzen nie Titerwerte $> 1:5$.

3. Brauchbarkeit des Intradermaltestes

An 6 Schafen wurde der Intradermaltest durchgeführt. Beim 1. Versuch benutzte ich *S.ovicanis*-Antigen mit einem Proteingehalt von 1,03 mg/ml und *S.ovifelis*-Antigen mit einer Proteinkonzentration von 1,24 mg/ml. Bei der PBS-Kontrolle konnte nach einer Stunde eine durchschnittliche Hautdickenzunahme von 0,9 mm gemessen werden, die bis zu 3. Stunde p.i. auf 0,75 mm sank und nach 7 Stunden den Ausgangswert wieder erreicht

hatte. Nach Kontrollinjektionen der gleichen Menge von PBS-BSA, Lammfleischpreßsaft und Tuberkulin mit derselben Proteinkonzentration traten dieselben geringen Hautdicken vorübergehend auf.

Beim *S.ovicanis*-Antigen lag der Meßwert nach einer Stunde bei 1,5 mm, fiel bis zur 5. Stunde auf 0,75 mm ab und begann ab der 9. Stunde wieder anzusteigen; er erreichte nach 24 Stunden ein Maximum von 1,9 mm (Abb.6a). Dann fiel der Wert allmählich ab, allerdings war nach 72 Stunden der Ausgangswert noch nicht wieder erreicht. In der Haut war noch eine Verdichtung des Gewebes zu tasten.

Bei Verwendung des *S.ovifelis*-Antigens wurde ebenfalls eine Zunahme der Hautdicke bis 1,1 mm gemessen. Auch hier nahm die Hautdicke bis zur 7. Stunde p.i. ab, um ab der 9. Stunde anzusteigen und ein Maximum von 1,2 mm nach 24 Stunden zu erreichen (Abb. 6a).

Der 2. Versuch wurde mit Antigenen der doppelten Proteinkonzentration durchgeführt. Mit *S.ovicanis*-Antigen stiegen die Werte der Hautdickenzunahme bis zur 9. Stunde p.i. an, um bis zur 48. Stunde p.i. auf der Höhe von 2,2 mm zu bleiben. Nach 72 Stunden p.i. war eine Abnahme auf 1,75 mm zu verzeichnen (Abb. 6b). Das doppelkonzentrierte *S.ovifelis*-Antigen verursachte eine Hautdickenzunahme um 2,25 mm nach 9 Stunden und 2,8 mm nach 24 Stunden p.i. Bis zur 72. Stunde war der Ausgangswert nicht wieder erreicht.

Bei Verwendung der doppelten Proteinkonzentration ergab sich also ein recht brauchbarer Nachweis einer Sarkosporidien-Infektion. Der Test kann bereits nach 9 Stunden spezifisch abgelesen werden; auch nach 48 Stunden ist eine Aussage noch möglich.

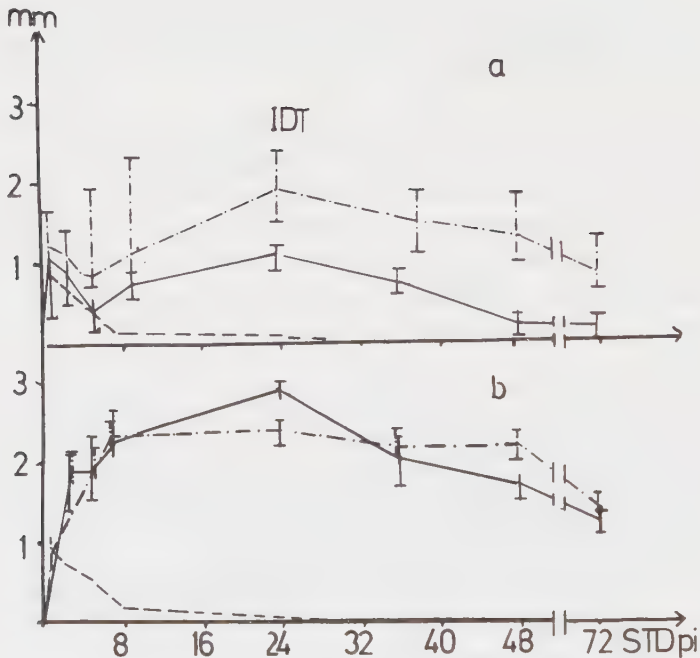


Abb. 6: Intradermaltest (IDT) an 6 mit *Sarcocystis ovicanis* und *S.spec.* experimentell infizierten Schafen mit Antigen von *S.ovicanis* (-.-.-.) und von *S.ovifelis* (—•—) mit einem Proteingehalt von 1,03 bzw. 1,24 mg/ml (a) und von 2,06 bzw. 2,48 mg/ml (b). - - - = PbS-Kontrolle

4. Parasitologische und serologische Untersuchungen an Schlachtschafen

Um die Brauchbarkeit sowohl des IFAT als auch des IHA für die Feststellung der Sarkosporidiose bei natürlich infizierten Tieren (Durchseuchungsuntersuchungen) zu überprüfen, sammelte ich Seren und Schlünde von

210 Schlachtschafen verschiedener Rasse sowie unterschiedlichen Alters und Geschlechts. Die Schlünde wurden mit der Schüttelmethode und der Trypsinmethode auf Sarkosporidien untersucht; dabei ergab sich ein Sarkosporidienbefall von 77 %. Es wurden 76,5 % Monoinfektionen mit *Sarcocystis ovicanis*, 11,3 % mit *S.spec.*, 8,6 % Mischinfektionen mit *S.ovicanis* und *S.spec.* und bei 3,7 % makroskopische Zysten von *S.ovifelis* festgestellt. Außerdem standen mir für die serologischen Untersuchungen weitere 464 Schafseren zur Verfügung; sie stammten von Schlachtschafen, die zu einem hohen Prozentsatz parasitologisch positiv (Sarkosporidienzystenträger) waren. Von diesen insgesamt 674 untersuchten Seren stammten 556 von Sarkosporidienträgern. 573 (= 85 %) reagierten im IFAT, 494 (= 73,3 %) im IHA (Tab. 2).

Titer	Anzahl der positiven Seren im	
	IFAT	IHA
< 1 : 40	101	180
1 : 40	120	98
1 : 80	187	116
1 : 160	150	120
1 : 320	77	87
1 : 640	35	60
1 : 1280	4	8
1 : 2560	-	4
1 : 5160	-	1
Positiv	573	494
1:40	85 %	73,3 %

Tab. 2: Verteilung der von 674 Schafen in den einzelnen Titerstufen reagierenden Seren im IFAT und IHA

Unter Berücksichtigung eines Grenztiters von 1:40 waren 363 Seren im IFAT und im IHA positiv. 45 Seren hatten nur im IHA und 118 nur im IFAT verwertbare Titer (Tab.3).

Tiere	Serologisch positiv im			Serologisch negativ
	IFAT und IHA	nur IHA	nur IFAT	
Parasitolog. positiv 556	363	45	118	30
Parasitolog. negativ 118	71	17	23	7
Gesamt 674	434	72	131	37

Tab. 3: Anzahl der Reagenten von 674 Schafen in Titerstufen von 1:40 bis 1:5120 von IFAT und IHA

30 Seren wiesen Titer von weniger als 1:5 auf, waren also negativ. Interessant ist ferner die Feststellung, daß von 118 parasitologisch negativen Tieren 71 im IFAT und im IHA Titer über 1:40, weitere 17 nur im IHA und 23 ausschließlich im IFAT positiv reagierten.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Die experimentelle Infektion von 9 Lämmern mit unterschiedlicher Zahl von Sporozysten von *S.ovicanis* und *S.spec.* erbrachte die klassischen Symptome einer Sarkosporidiose, wie sie von HEYDORN und GESTRICH (1976) sowie von MUNDAY, BARKER und RICKARD (1975) und von LEEK, FAYER und JOHNSON (1978) beschrieben wurden. Das in Abhängigkeit von der Infektionsdosis mehr oder weniger stark ausgeprägte Auftreten des zweigipfligen Fiebers, von Inappetenz, Dyspnoe, Anämie und Festliegen bei allen Tieren deutet auch darauf hin, daß die Tiere nicht schon vor Versuchsbeginn mit *S.ovicanis* infiziert waren; denn ERBER und GEISEL (1979) hatten beim Schwein nachgewiesen, daß eine Reinfektion mit der homologen Art am gleichen Tier nicht mehr angeht. So wurde von zwei meiner Versuchstiere eine nach LEEK und FAYER (1978) letale Dosis von 500 000 *S.ovicanis*-Zysten symptomlos überstanden. Auch konnte ich bei der am 43. Tag nach der Reinfektion durchgeführten Biopsie keine unreifen Zysten nachweisen. Damit wurden die von ERBER und GEISEL (1979) gefundenen Ergebnisse bestätigt. Ob die *S.ovifelis*-Infektion bei zwei Lämmern angegangen ist, konnte ich nicht bestätigen, da bei dieser heterologen Superinfektion klinische Symptome nicht auftraten; darüber hinaus ist bei *S.ovifelis* der Parasitennachweis erst nach einem Jahr zu führen (ERBER, pers. Mitteilung).

Um das Angehen meiner experimentellen Erstinfektion zu überprüfen, wurden ab dem 72. Tag p.i. Biopsien (Zysten-nachweis) gemacht. Bei der parasitologischen Untersuchung der entnommenen Muskelstücke konnte ich reife Zysten von *S.ovicanis* und *S.spec.* nachweisen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von HEYDORN und GESTRICH (1979), die ab dem 68. Tag p.i. reife Zysten beobachteten. Ob die reifen Zysten von *S.spec.*, die von BIERSCHECK (1979) erstmals in größerem Umfang bei Schlachtschafen entdeckt worden waren, aus dem mir zur Verfügung stehenden Infektions-

material stammten, oder ob die Lämmer diese Zysten als Bestandsinfektion mitbrachten, kann ich nicht sagen; denn der Endwirt dieser Art ist noch unbekannt.

Die im Vergleich zur 1. Biopsie bei der 2. verminderte Anzahl von Zysten sowie die degenerativen Erscheinungen an den Vorwölbungen lassen sich möglicherweise mit einer zellulären Reaktion des Wirtsorganismus gegen die Zysten deuten; denn ich konnte im histologischen Muskelpräparat Zellinfiltrationen um die Zysten beobachten.

Da bisher systematische serologische Untersuchungen auf Sarkosporidieninfektionen über einen langen Zeitraum bei Schafen nicht vorlagen, ist ein Vergleich meiner Ergebnisse mit denen anderer Autoren kaum möglich.

Obwohl die makroskopischen *S.ovifelis*-Zysten nur bei etwa 3 % der Schafe auftraten, wurden sie von mir und von AWAD (1958), PIEKARSKI, SCHÄFER und NIEDERLÄNDER (1961), PEREIRA und PEREZ (1976) sowie von TADROS, LAARMAN und VAN DEN EIJK (1974) für die serologischen Untersuchungen verwendet und empfohlen. Die Parasiten lassen sich ohne anhaftendes Muskeleiweiß gewinnen und ermöglichen ein Arbeiten mit reinem Parasiteneiweiß.

Im Fluoreszenztest erfolgte bei meinen Schafen ein Titeranstieg zwischen dem 20. und 30. Tag; danach erreichten die Titer ein Maximum von 1:1280 bis etwa zum 60. Tag. NEDJARI, JUNGSMANN und HIEPE (1976) beobachteten bei experimentell mit *S.fusiformis* infizierten Kälbern einen ersten Titeranstieg bis 1:640 nach 4 Wochen, der sich bis zum 90. Tag (Ende der Untersuchung) hielt. Bei meinen Lämmern fielen die Titer bis zum 64. Tag allmählich ab, um sich auf 1:160 einzupendeln. Der Titerverlauf geht in etwa mit der Infektion konform insofern, als Titerbewegungen schon zwischen 4. und 11. Tag p.i. (1.Schizogonie) festgestellt werden, die ein Maximum zum Zeitpunkt der 2. Schizogonie etwa zwischen 21. und 38. Tag erreichen um bis zur Zystenreife (etwa 70. Tag) ein hohes Niveau zu halten.

Kommt es bei einer Reinfektion zum erneuten Kontakt zwischen Parasit und Wirt, kann man schon nach 11 bis 21 Tagen einen sprunghaften Titeranstieg im Sinne einer Boosterreaktion beobachten; dies ist vielleicht der Grund für das Nichtangehen homologer Reinfektionen. Der von mir erarbeitete Titerverlauf im indirekten Hämagglutinationstest (IHA) deckt sich in etwa mit den Beobachtungen von LUNDE und FAYER (1977) am Kalb nach künstlicher Infektion mit *S.fusiformis*. Die Maxima in meinen Titerverlaufskurven könnte man in einer Beobachtung von FAYER und LUNDE (1977) belegen, welche einen Anstieg von IgM ab der 4. und 8. Woche im Plasma und ab der 10. und 11. Woche von IgG bei mit Sarkosporidien infizierten Kälbern fanden. Die Autoren fanden dabei zur Zeit des IgG-Anstiegs höhere Titer im IHA als zur Zeit der IgM-Zunahme.

Der Grenztiter wurde in beiden Tests auf 1:40 festgelegt, da meine infizierten Tiere Anfangstiter von 1:20 und 1:40 im IFAT und von 1:10 bis 1:20 im IHA zeigten. Die Titer gegen Ende der Untersuchungen lagen im IFAT bei 1:80 und 1:160, ebenso im IHA.

Bei Durchseuchungsuntersuchungen am Münchner Schlachthof (210 Seren und Muskelproben) fand ich einen Sarkosporidienbefall von 77 % durch direkten Erregernachweis. 76,5 % der Tiere hatten eine Monoinfektion mit *S.ovicanis*; dagegen berichten BOCH und Mitarb. (1979) von Monoinfektionen nur bei 10,7 % der Proben. Monoinfektionen mit *S.spec.* beobachtete ich bei 11,1 % der Tiere, während BOCH und Mitarb. (1979) bei 33,6 % der untersuchten Tiere nur *S.spec.* isolierten.

Von 674 Seren, von denen 82,5 % von parasitologisch positiven Tieren stammten, fand ich bei 85,0 % im IFAT Titer ab 1:40. Im IHA konnte ich bei 73,3 % der untersuchten Seren Titer ab 1:40 finden. Die größere Anzahl der im IFAT als positiv erfaßten Seren stimmt mit den Ergebnissen von O'DONOGHUE und FORD (1977) sowie von

DIEZ-BANOS, CORDERO DEL CAMPILLO und ROJO-VAZQUEZ (1978) überein; bei einem Vergleich verschiedener Methoden fanden sie den IFAT als die zuverlässigste Methode.

Vergleicht man den tatsächlichen Parasitenbefall und die festgestellten positiven Seren, so läßt sich sagen, daß bei 556 parasitologisch positiven Tieren im IFAT 481 (87 %), im IHA 408 (73 %) erfaßt wurden. Die 30 negativen Seren lassen sich auf schon lange bestehende Infektionen oder auf schlechte Antikörperbildung dieser Tiere zurückführen. Von 118 parasitologisch negativen Tieren hatten 88 im IHA und 94 im IFAT Titer, 7 waren auch serologisch negativ.

Die positiven Titer bei parasitologisch negativen Tieren, wie sie auch von ARRU und Mitarb. (1978) sowie von DIEZ-BANOS, CORDERO DEL CAMPILLO und ROJO VAZQUEZ (1978) festgestellt wurden, können verschiedene Ursachen haben. Zum einen erfassen die Nachweismethoden nur Infektionen mit reifen Zysten, zum anderen sind Titer schon ab dem 30. Tag p.i. vorhanden. Auch eine noch junge *S.ovifelis*-Infektion, die sicher antigene Wirkung hat, deren Zysten aber frühestens nach einem Jahr erfaßt werden können, kann derartige Titer verursachen.

Für den IDT fehlen mir Vergleichsmöglichkeiten mit Sarkosporidienantigen beim Schaf. AWAD (1957) führte den IDT an mit Sarkosporidien infizierten Meerschweinchen durch, maß aber nicht die Hautdickenzunahme, sondern den Durchmesser des auftretenden Erythems. BEHRENS (1979) schreibt für die Tuberkulinprobe am Schaf, daß allein die Hautdickenzunahme entscheidend ist für die Beurteilung des Tests. Vergleicht man in meinem IDT das Verhalten der Hautdickenzunahme der PbS- sowie der anderen Kontrollen mit der durch das spezifische Antigen, so kann man durchaus von einer antigenspezifischen Hautdickenzunahme sprechen; diese war bei der doppelten Proteinkonzentration auch noch nach 72 Stunden ablesbar. Es wäre interessant, diesen Test an einer größeren Schafpopulation mit bekanntem Parasitenstatus durchzuführen.

Zusammenfassung

Der Immunfluoreszenztest (IFAT) und die indirekte Hämagglutination (IHA) wurden auf ihre Brauchbarkeit zum Nachweis der Sarkosporidieninfektion des Schafes überprüft bzw. entwickelt. Als Antigene dienten Zystozoiten sowie wasserlösliche Extrakte von *Sarcocystis ovifelis*.

Bei 9 mit 5000 bzw. 50 000 Sporozysten von *S.ovicanis* und *S.spec.* experimentell infizierten und zur Zeit der 1. und 2. Schizogonie klinisch kranken Lämmern konnten im IFAT und dem erstmals auf *Sarcocystis*-Antigene eingestellten IHA Sarkosporidienantikörper nachgewiesen und Titerverlaufskurven erstellt werden. Erste Titeranstiege wurden im IFAT 4 - 12 Tage p.i. mit Werten von 1:80 bis 1:160 beobachtet, Maximaltiter von 1:1280 21 bis 38 Tage p.i. erreicht. Zwischen dem 41. bis 64. Tag p.i. begannen die Titer abzufallen und lagen 155 Tage p.i. bei 1:80 und 1:160. Im IHA zeigten sich erste Titeranstiege 7 bis 14 Tage p.i. Nach Erreichen von Maximalwerten zwischen 1:1280 und 1:10240 41 bis 86 Tage p.i. sanken die Titer allmählich ab und lagen 155 Tage p.i. ebenfalls bei 1:80 und 1:160. Homologe und heterologe Reinfektion von 4 Schafen, 159 Tage p.i., bewirkten einen kurzfristigen Titeranstieg um 3-4 Stufen im IFAT und 3-5 im IHA 11 bis 21 Tage p.i. Bei der serologischen Untersuchung von 674 Feldseren, die zu 82,5 % von parasitologisch positiven Schafen stammten, reagierten 85,0 % im IFAT und 73,3 % im IHA positiv.

Ein orientierend durchgeführter Intradermaltest mit Zystozoitenextrakten von *S.ovicanis* und *S.ovifelis* bewirkte vom Proteingehalt abhängige Hautdickenzunahmen von 1,5 bis 3 mm nach 9 bis 48 Stunden.

ROSCHER, B. The suitability of the immunofluorescent antibody test and the indirect haem-agglutination as serodiagnostic tools in ovine sarcosporidiosis

Summary

The immunofluorescent antibody test (IFAT) and the indirect haemagglutination (IHA) were tested and modified for their serodiagnostic suitability in Sarcocystis infections of sheep.

Antigenes employed were cystozoites and watersoluble extracts of Sarcocystis ovifelis.

In sera of 9 with 5000 or 50 000 sporocysts of Sarcocystis ovicanis and S.spec. experimentally infected lambs, specific antibodies to Sarcocystis could be demonstrated and the antibody formation studied over a period of 230 days by means of IFAT and a modified IHA.

Fluorescent antibodies showed first titre rises 4-12 days post infection up to 1:80 and 1:160. Maximum values of 1:1280 appeared 21-38 days p.i. From days 41-64 onwards the titres declined to values between 1:80 and 1:160 155 days p.i.

Antibody titres demonstrated by means of IHA rose between 7 and 14 days p.i. Maximum titres (1:1280 - 10240) were observed 41-86 days p.i. After that the titres declined to 1:80 and 1:160 155 days p.i.

Homologous and heterologous reinfection of 4 lambs 159 days p.i. caused transitory titre rises 11-21 days post reinfection 3 - 4 steps (IFAT) and 3-5 steps (IHA) respectively.

The serological investigation of 674 ovine sera obtained from slaughterhouses, 82,5 % of them were parasitologically positive, revealed antibodies to Sarcocystis by means of IFAT and IHA in 85 % and 73,3 % respectively.

An intradermal test (IDT) showed positive skin reactions 9 to 48 hours after the application of cystozoite-extracts of S.ovicanis and S.ovifelis.

VI. Literaturverzeichnis

- Andrade de C.M., G. Weiland (1971): Serologische Untersuchungen zur Feststellung gemeinsamer Antigene von Toxoplasmen, Sarkosporidien und Kokzidien. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 84, 61-64
- Arru, E., A.M. Cosseddu, S. Tarantini, J. Sassari (1978): L'immunofluorescenza nella diagnosi della sarcosporidiosi ovina e suina. Clin. vet. 101, 195-200
- Aryeetey M.E., G. Piekarski (1976): Serologische Sarcocystis-Studien an Menschen und Ratten. Z. Parasitenkd. 56, 211-218
- Awad, F.J. (1957): The intradermal sarcocystin test. Am. J. Vet. Res. 18, 703-704
- Awad, F.J. (1958): The complement fixation test in the diagnosis of sarcosporidiosis. Am. J. Vet. Res. 19, 1010-1012
- Behrens, H. (1979): Lehrbuch der Schafkrankheiten. 2.Aufl. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- Bierschenck, A. (1979): Das Vorkommen von Sarkosporidien bei Schlachtschafen in Süddeutschland. Vet. med. Diss., München
- Boch, J., A. Bierschenck, M. Erber, G. Weiland (1979): Sarcocystis- und Toxoplasmen-Infektionen bei Schlachtschafen in Bayern. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 137-141
- Boch, J., R. Supperer (1977): Veterinärmedizinische Parasitologie. 2. Aufl. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- Coons, A.H., H.J. Creech, R.N. Jones, E. Berliner (1942): The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by use of fluorescent antibody. J. Immunol. 45, 159
- Coons, A.H., M.H. Kaplan (1950): Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. exp. Med. 91, 1
- Diez-Banos, P., M. Cordero del Campillo, F.A. Rojo-Vazquez (1978): Sheep sarcosporidiosis in Leon (Spain) with a comparison of several diagnostic procedures. 4th Congr. Parasit. 19-26 Aug. 1978, Warszawa, 90-91

- Engvall, E., P. Perlmann (1972): Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitation of specific antibodies by enzyme labeled antiimmunoglobuline in antigen coated tubes. *J. Immunol.* 109, 129-135
- Erber, M. (1977): Möglichkeiten des Nachweises und der Differenzierung von zwei Sarkosporidienarten des Schweines. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 90, 480-482
- Erber, M., O. Geisel (1979): Untersuchungen zur Klinik und Pathologie der Sarcocystis suicanis-Infektion des Schweines. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 92, 197-202
- Fayer, R., M.N. Lunde (1977): Changes in serum and plasma proteins and in IgG and IgM antibodies in calves experimentally infected with Sarcocystis from dogs. *J. Parasitol.* 63, 438-442
- Fulton, R.D., A. Voller (1964): Evaluation of immuno-fluorescent and direct agglutination methods for specific Toxoplasma antibodies. *Brit. med. J.* 2, 1173-1175
- Gestrich, R., M. Schmitt, A.O. Heydorn (1974): Pathogenität von Sarcocystis tenella-Sporozysten aus den Fäzes von Hunden für Lämmer. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 87, 362-363
- Gestrich, R., A.O. Heydorn, N. Baysu (1975): Beiträge zum Lebenszyklus von Sarkosporidien. II. Untersuchungen zur Artendifferenzierung von Sarcocystis fusiformis und Sarcocystis tenella. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 88, 191-197 und 201-102
- Heydorn, A.O., R. Gestrich (1976): Beiträge zum Lebenszyklus von Sarkosporidien. III. Entwicklungsstadien von Sarcocystis ovis im Schaf. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 89, 1-5
- Heydorn, A.O., R. Gestrich, H. Mehlhorn, M. Rommel (1975): Proposal for a new nomenclature of the Sarcosporidia. *Z. Parasitenkd.* 48, 73-82
- Jungmann, R., Th. Hiepe (1975): Neue Erkenntnisse über die Sarkosporidiose. *Mhft. Vet. Med.* 30, 102-108
- Klima, U.M. (1979): Versuche zum Nachweis von Sarkosporidieninfektionen bei Haustieren mit dem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Vet. med. Diss.*, München
- Leek, R.G., R. Fayer, A.J. Johnson (1977): Sheep experimentally infected with Sarcocystis from dogs. I. Disease in young lambs. *J. Parasitol.* 63, 642-650

- Leek, R.G., R. Fayer (1978): Sheep experimentally infected with *Sarcocystis* from dogs. II. Abortion and disease in ewes. *Cornell Vet.* 68, 108-123
- Lunde, M.N., R. Fayer (1977): Serologic test for antibody to *Sarcocystis* in cattle. *J. Parasitol.* 63, 222-225
- Mayr, A., P.A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann (1977): *Virologische Arbeitsmethoden*, Bd.II. Verl. Gustav Fischer, Stuttgart, New York
- Munday, B.L., A. Corbould (1974): The possible role of the dog in the epidemiology of ovine sarcosporidiosis. *Brit. vet. J.* 130, IX-X
- Munday, B.L., K. Barker, M.D. Rickard (1975): The developmental cycle of a species of *Sarcocystis* occurring in dogs and sheep, with observations on pathogenicity in the intermediate host. *Z. Parasitenkd.* 46, 111-123
- Nedjari, T., R. Jungmann, Th. Hiepe (1976): Immundiagnostischer Nachweis einer experimentellen *Sarcocystis bovicanis*-Infektion beim Rind mit der indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Reaktion. *Mhft. Vet. Med.* 31, 946-947
- O'Donoghue, F.J., G.B. Ford (1977): Factors influencing the epidemiology of ovine sarcosporidiosis. *WAAVP, 8th Intern. Conf. Sydney 1977*, 99
- Pereira, L., M. Perez (1976): Relacion IFI-intensidad del parasitismo *Sarcocystis* spp. *Ier. Comp. Nac. parasit.* 29 sept - 2. oct.1976, Granada, Spain
- Piekarski, G., M. Saathoff (1962): Vergleichende serologische Untersuchungen mit Sarkosporidien- und Toxoplasmen-Antigenen. *Z. Parasitenkd.* 21, 363-380
- Piekarski, G., E. Schäfer, R. Niederländer (1961): Mikroskopische und serologische Studien über die Häufigkeit von *Sarcocystis tenella* bei Schafen. *Z. Parasitenkd.* 20, 479-488
- Rommel, M., A.O. Heydorn, F. Gruber (1972): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. I. Die Sporozysten von *S.tenella* in den Fäzes der Katze. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 85, 101-102
- Rommel, M., A.O. Heydorn, B. Fischle, R. Gestrich (1974): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. V. Weitere Endwirte der Sarkosporidien von Rind, Schaf, Schwein und die Bedeutung des Zwischenwirtes für die Verbreitung dieser Parasitose. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 87, 392-396

- Rommel, M. (1975): Neue Erkenntnisse zur Biologie der Kokzidien, Toxoplasmen, Sarkosporidien und Besnoitien. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 88, 112-117
- Ruijtenberg, E., J.F. van Knapen (1977): The enzyme linked immunsorbent assay and its application for parasitic infections. J. infect. Dis. 136, 267-273
- Tadros, W., J.J. Laarman, A. van den Eijk (1974): The demonstration of antibodies to Sarcocystis fusiformis antigen in sera of Isospora hominis carriers using the indirect fluorescent technique. Z. Parasitenkd. 43, 221-224
- Tanabe, K., I. Kimata, M. Iseki, S. Takada (1977): Separation of Toxoplasma tachyzoites by filtering peritoneal exudate of infected mice through cellulose powder. Jap. J. Parasit. 26, 113-115
- Weir, D.M. (1973): Handbook of experimental immunology. Second edition. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. J. Boch für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für die stets gerne gewährte Unterstützung und Anregung.

Herrn Dr. Weiland danke ich herzlich für die Einführung in die Grundlagen der serologischen Arbeit und für die zahlreichen kritischen Anregungen und Hinweise.

Herrn Dr. Erber danke ich für die Bereitstellung des infektiösen Materials.

Lebenslauf

19.11.1953	geboren in Frauenau als Tochter des prakt. Arztes Dr. Franz Roscher und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Schraufstätter
1959 bis 1969	Besuch der Volksschule in Frauenau
1963 bis 1972	Besuch des Neusprachl. Gymnasiums in Zwiesel
1972	Reifeprüfung
1972 bis 1973	2 Semester Agrarwissenschaft an der TU München - Weihenstephan
1973 bis 1978	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Dezember 1978	Examen und Approbation als Tierärztin
Dez. 1978 bis Dez. 1979	Anfertigung dieser Dissertation am Institut für Vergleichende Tropen- medizin und Parasitologie

